

УДК: 619:578.832.1:636.5:616-076

Музыка Н.Н., Стегний Б.Т*(Институт животноводства НААН, ННЦ «ИЕКВМ»)*

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЭНТЕРИТА ГУСЕЙ В ОДНОМ РАЗВЕДЕНИИ

Ключевые слова: ИФА тест-система, вирус энтерита гусей, серологическая диагностика

Введение.

Вирусный энтерит гусей (болезнь Держи, Enteritis viralis anserculorum) - острая контагиозная болезнь молодняка гусей и мускусных уток, которая характеризуется поражением печени, легких, катарально-геморрагическим воспалением кишечника и высокой летальностью гусят первых 30-ти дней жизни. Заболевание наносит большие экономические убытки. При вспышках инфекции гибель гусят и мускусных утят может достигать 70-100 %. Переболевшая птица остается вирусоносителем в течение 5-6 лет [1]. Для диагностики вирусного энтерита применяют серологические методы - реакцию непрямой гемагглютинации, реакцию нейтрализации, реакцию диффузной преципитации. Самой чувствительной и высокоспецифичной считается реакция нейтрализации в культуре клеток фибробластов гусиных эмбрионов, но она трудоемкая и длительная - результат исследования известен только через 21 день [5]. Реакция непрямой гемагглютинации позволяет провести эпизоотологическую оценку относительно вирусного энтерита гусей в хозяйстве, определить уровень поствакцинального иммунитета, но чувствительность ее недостаточная [4]. Одним из современных высокочувствительных диагностических методов считается иммуноферментный анализ (ИФА). Сегодня ИФА широко используется для диагностики большинства вирусных и бактериальных болезней птиц. По данным зарубежных ученых для диагностики вирусного энтерита гусей применяют твердофазный ИФА [6, 7, 8, 9], но в Украине отсутствуют коммерческие тест-системы как отечественного, так и зарубежного производства.

Поэтому целью нашей работы было разработать иммуноферментную тест-систему для серологической диагностики заболевания, отработать условия постановки реакции, а также провести ее сравнительные исследования с реакцией ней-

трализации.

Материалы и методы

Как антиген для иммобилизации на планшеты использовали вакцинный штамм вируса энтерита гусей BBS-99, очищенный и концентрированный методом ультрацентрифугирования через градиент плотности сахарозы-хлористого цезия [5] в нашей модификации. В качестве положительного контроля использовали гипериммунную сыворотку крови гусей с титром 1:5120 в РН.

Негативную сыворотку получали от клинически здоровых гусят, которые не имели антител к вирусному энтериту. В работе использовали коммерческий конъюгат (антивидовой иммунопероксидазный против Ig G гусей производства филиала «Медгамал» ГП НИИЭМ им. М.Ф. Гама-леи РАМН, г. Москва) и АБТС (SIGMA-ALDRICH) как субстрат. Показатели оптической плотности (ОП) учитывали при длине волны 405 нм против 450 нм. Титр (Т) антител в пробах сыворотки крови гусей в ИФА определяли методом последовательных разведений сывороток и в одном рабочем разведении по S/P отношению [2]. Для обработки данных ИФА использовали компьютерную программу Statistika. Постановку РН проводили с постоянной дозой вируса по общепринятой методике [3].

Результаты исследований

Для определения оптимального рабочего разведения исследуемых сывороток методом непрямого иммуноферментного анализа было исследовано 152 пробы с различным уровнем антител к вирусу энтерита гусей в разведениях 1:100, 1:200, 1:400. Для каждого разведения вычисляли значения S/P и определяли коэффициент корреляции, который составил 0,86 для разведения 1:100; 0,93 для разведения 1:200 и 0,92 для разведения 1:400. Разведение 1:200 имело наибольший коэффициент корреляции, поэтому было выбрано рабочим.

В соответствии со значениями ОП ис-

следуемых сывороток была построена линия регрессии, отражающая зависимость между IgT ИФА, определенным методом последовательных разведений, и Ig S/P, рассчитанным для каждой сыворотки в рабочем разведении 1:200. Уравнение для расчета титра антител имело вид: $Lg T = 3,2899 + 1,3436 * Lg (S/P200)$.

Установлены оптимальные значения положительной и отрицательной контрольных сывороток: для отрицательного

контроля - не выше 0,19, для положительного - не ниже 0,7, минимальная допустимая разница ОГ контролей не должна превышать 0,7.

С целью определения позитивно-негативного порога взяли 54 сыворотки крови от гусей, не имеющих антител к вирусу энтерита, и исследовали в тест-системе ИФА методом последовательных разведений. В результате проведенных расчетов при определении качественной харак-

Таблица 1 – Сравнительное исследование сывороток крови на наличие антител в ВЭГ в ИФА и РН

Хозяйство	Группа гусей* ¹	Срок после вакцинации	Среднегеометрический титр антител		Характеристика* ²	
			ИФА	РН, log ₂	ИФА	РН
хоз-во Харьковской обл.	1	1 мес.	1:825±209	7,85±0,28	+	+
	2		1:3987±422	9,69±0,37	+	+
хоз-во Донецкой обл.	1		1:4838±102	10,45±0,5	+	+
	2		1:5911±150	10,62±0,31	+	+
хоз-во Харьковской обл.	1	2 мес.	1:1023±244	7,65±0,43	+	+
	2		1:2911±424	9,4±0,52	+	+
хоз-во Донецкой обл.	1		1:3495±336	9,82±0,63	+	+
	2		1:4547±241	10,52±0,3	+	+
хоз-во Харьковской обл.	1	3 мес.	1:607±89	8,35±0,39	+	+
	2		1:2512±221	10,29±0,38	+	+
хоз-во Донецкой обл.	1		1:3227±176	9,93±0,48	+	+
	2		1:4509±299	10,5 ± 0,26	+	+
хоз-во Харьковской обл.	1	4 мес.	1:510±127	8,05±0,22	+	+
	2		1:2636±330	10,92±0,25	+	+
хоз-во Донецкой обл.	1		1:2690±461	10,32±0,17	+	+
	2		1:4910±375	10,68±0,27	+	+
хоз-во Харьковской обл.	1	5 мес.	1:520±144	8,95±0,35	+	+
	2		1:2346±431	10,36±0,37	+	+
хоз-во Донецкой обл.	1		-	-	+	+
	2		-	-	+	+
хоз-во Харьковской обл.	1	6 мес.	1:535±104	5,81±0,44	+	+
	2		1:1763±396	7,15±0,47	+	+
хоз-во Донецкой обл.	1		-	-	+	+
	2		-	-	+	+

*¹ группа 1 – вакцинированы двукратно живой вакциной;

группа 2 - живая+инактивированная вакцины;

*² позитивными (+) сыворотки считаются: в ИФА с титром 275 и больше, в РН – с 5,0 log₂

теристики исследуемых сывороток крови по рассчитанному титру антител результаты ИФА характеризовали как положительные ($T > 275$), сомнительные ($1:137 < T < 1:275$) и отрицательные ($T < 137$).

Для валидации тест-системы проведено изучение поствакцинального иммунитета родительских стад гусей в двух хозяйствах.

Сыворотки крови исследовали каждый месяц в течение репродуктивного периода в ИФА и РН. Результаты параллельного исследования представлены в таблице 1.

Титры антител в РН в опытных группах были на уровне 10,36 и 9,92 \log_2 , в контрольных - 8,96 и 9,28 \log_2 в хозяйствах Харьковской и Донецкой областей соот-

Таблица 2. Титры антител у гусят к вирусному энтериту

№ пробы	Титр антител в ИФА	Титр антител в РН, \log_2
1	780	6,32
2	1913	8,32
3	538	6,82
4	501	6,32
5	1791	7,82
6	1642	8,32
7	361	5,32
8	575	6,82
9	1168	7,82
10	597	6,82
11	1425	8,32
12	675	7,32
13	709	7,32
14	473	6,32
15	857	8,32
16	436	6,32
Среднегеометрический титр антител	902 \pm 133	7,16 \pm 0,24

Таблица 3 - Оценка поствакцинального иммунитета гусей
родительского стада

Срок после вакцинации	Кол-во проб	Среднегеометрический титр антител
2 недели (пт. 1)	20	3650 \pm 304
2 месяца (пт. 1)	20	2940 \pm 203
2 месяца (пт. 2)	15	2702 \pm 316
3 месяца (пт. 1)	15	2045 \pm 188
3 месяца (пт. 2)	15	1045 \pm 136

ветственно. Как видно из таблицы 1, титры антител, определенные методом ИФА, отражали защитный уровень антител у привитых гусей, что подтверждали результаты РН.

Также мы исследовали сыворотки крови суточных гусят, полученных от привитых против вирусного энтерита родителей. Результаты приведены в таблице 2.

При сравнительном анализе чувствительности метода ИФА и РН получены идентичные закономерности, не отмечено существенной разницы в титрах антител.

Также нами в одном из хозяйств Украины была проведена оценка иммунитета родительского стада гусей после прививки вакциной Palmivax (Франция). Исследования проводили в ИФА разработанной нами тест-системой. (таблица 3).

Резюме: В статье представлены данные по разработке тест-системы ИФА для выявления антител к вирусу энтерита гусей в одном разведении, результаты апробации и сравнительных исследований полевых сывороток в ИФА и реакции нейтрализации.

SUMMARY

The article presents data on the development of ELISA kit-systems to detect antibodies to the virus enteritis of geese in one dilution, the results of testing and comparative studies of field sera by ELISA and neutralization test.

Keywords: ELISA kit-system, geese enteritis virus, serological diagnosis

Литература

1. Качанова С.П. Вирусный энтерит гусей // Ветеринария № 8, 1983 – С. 15-23.
2. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием серологических реакций Ч.1 / ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2008. – 306 с.
3. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие / [Головко А.Н., Ушкалов В.А., Скрыпник В.Г. и др.]; под ред. А.Н. Головки. – Х. «НТМТ», 2007. – 512 с.
4. Музыка Н.Н. Изучение иммунного статуса гусей при вирусном энтерите серологическими методами / Музыка Н.Н., Белецкая А.В., Безрукавая И.Ю. и др. // Птахівництво: Міжв. тем. наук. збірн. за мат. V Укр. конф. по птах. з міжн. участ.: Харків, 2004. - В.55. - С. 546-550.
5. Суворов А.В. Реакция нейтрализации в диагностике вирусного энтерита гусей // Актуальные вопросы профилактики и лечения болезней с.-х. животных: Тез. докл. Всесоюзной науч.-технич. конф. молодых ученых. - М., 1985. - С. 251.
6. Трефилов Б. Б. Оценка поствакцинального иммунитета при вирусном энтерите гусей методом иммуноферментного анализа / Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Д.В. Маслов // Материалы междунаrod. науч.-практ. конф., посвященной 110-летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России, 21 – 22 сентября 2006 г. - 2006. – С. 200 – 206.
7. Have P. Detection of goose parvovirus antibodies by microneutralis and enzyme – linked immunosorbent assay / P. Have, H. S. Hansen // Proc. 7 th. World Vet. / Poult. Assoc. – Oslo, Norway, 1993. - P. 60.
8. Jestin V. Demonstration of very pathogenic parvovirus (Derzsy disease virus) in Muscavy duck farms / V. Jestin, M. Le Bras, M. Cherbonnel // Reel. Med. – 1991. - Vet. – V. 167 – P. 849 – 857.
9. Kwang M. J. Detection of antibodies against goose parvovirus by on enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) / M. J. Kwang, H. J. Tsai, Y. S. Lu // J. Chin. Soc. Vet. Sci. – 1987. - V. 13 - P. 17 – 23.

Контактная информация об авторах для переписки

Музыка Н.Н. – младший научный сотрудник, Институт животноводства НААН, Институт животноводства НААН, Украина, 62404, Харьковская обл., Харьковский р-н, пгт. Кулинич, ул. 7-ой Гвардейской армии, 3, muzukanat@rambler.ru

Стегний Б.Т. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик НААН и РАСХН, директор ННЦ «ИЕКВМ», Национальный научный центр <<Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины>>, Украина, 61023, Харьков, ул. Пушкинская 83, тел. +38057 707-10-90